

## Påverkar klimatförändringen trofisk fraktionering av C och N mellan växt och konsument i sötvattenekosystem?

---

*Does climate change affect trophic fractionation across the plant-consumer-interference in freshwater ecosystems?*

Evelina Hiltunen

Examensarbete i miljövetenskap – 15 hp

Biologi och miljövetenskap – kandidatprogram

Institutionen för vatten och miljö, Sveriges lantbruksuniversitet

Uppsala 2018

# Påverkar klimatförändringen trofisk fraktionering av C och N i näringskedjan mellan växt och konsument i sötvattenekosystem?

*Does climate change affect trophic fractionation across the plant-consumer-interference in freshwater ecosystems?*

Evelina Hiltunen

**Handledare:** Willem Goedkoop, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för vatten och miljö  
**Bitr. handledare:** Simon Belle, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för vatten och miljö  
Jenny Nilsson, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för vatten och miljö  
**Examinator:** Richard Johnson, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för vatten och miljö

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i miljövetenskap - kandidatarbete  
**Kurskod:** EX0688  
**Program/utbildning:** Biologi och miljövetenskap – kandidatprogram  
**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2018  
**Serietitel:**  
**Delnummer i serien:**  
**ISSN:**  
**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>  
**Nyckelord:** *Chironomus riparius*, stabila isotoper, trofisk fraktionering, klimatförändring, oligotrofiering

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för vatten och miljö  
Sektionen för ekologi och biodiversitet

## Sammanfattning

Temperaturhöjningen som en följd av klimatförändringen väntas gå fortast och bli störst på Nord- och Sydpolen. När lufttemperaturen stiger, stiger även vattentemperaturer och vegetationsgränser flyttas. Detta skulle kunna vara orsaken till den näringsutarmning som kan ses i många arktiska sjöar. Dock har orsaken till oligotrofieringen inte klarlagts. En forskningsgrupp på Sveriges lantbruksuniversitet undersöker hur arktiska sötvattenssjöar och dess ekosystem långsiktigt påverkas av oligotrofiering som ett resultat av klimatförändringen. Stabila isotoper av bland annat kol (C) och kväve (N) används när näringsflöden och näringsvävar i ekosystem studeras. För varje trofinivå hos akvatiska organismer ökar isotopsammansättningen av  $^{13}\text{C}$  och  $^{15}\text{N}$  med 0,8 ‰ respektive 3,4 ‰. Skillnaden i isotopsammansättningen mellan ett djur och dess föda kallas trofisk fraktionering. I denna studie utförs ett laboratorieförsök där fjädermygglarven *Chironomus Riparius* kultiveras med tre olika födotyper (allöv, TetraMin® och *Chlorella* sp.) i tre olika temperaturer (15°C, 18°C och 23°C). Syftet med studien är att undersöka *om* och *vilken* påverkan temperaturen har på trofisk fraktionering av C och N i näringskedjan mellan växt och konsument. Studien ska hjälpa forskningsgruppen att tolka paleolimnologiska data, exempelvis sedimentproppar från arktiska sjöar. Med hjälp av isotopdatering och skallar från fjädermygglarver kan tidigare väderförhållanden och artsammansättningar i sjöar rekonstrueras. Detta kan hjälpa forskare att tyda och förutse de ekologiska effekterna av klimatförändringen.

I studien beräknades den trofiska fraktioneringen i två olika utfall: ett där isotopsammansättningen i färsk föda används och det andra där isotopsammansättningen i den ansamlade födan används. Resultaten visar att med TetraMin® som födokälla har temperaturen en signifikant påverkan på  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen i *C. riparius*, i båda utfallen, där fraktioneringen avtar med stigande temperatur. Dock är det sannolikt att lipidhalten i fjädermygglarverna orsakar sambandet. Efter en matematisk lipidnormalisering av  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen har temperaturen ingen påverkan. Temperaturen påverkar inte  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen i *C. riparius* med TetraMin® som födokälla. Med *Chlorella* sp. som födokälla erhöles fjädermygglarver endast från två temperaturer och standardavvikelsen var stor. Därav tas inga slutsatser från dessa mätvärden. I försöket med allöv som födokälla var dödligheten 100% och därför saknas mätvärden. Med resultaten från denna studie anses att vid fraktioneringsberäkningar ska isotopsammansättningen i den ansamlade födan användas då denna efterliknar naturliga förhållanden mer. Det bör även utföras en lipidnormalisering, då lipidhalten kan leda till feltolkningar i fraktioneringen.

Slutsatsen är att paleolimnologiska sedimentprover inte behöver korrigera för temperaturen vid isotopanalyser för att kunna rekonstruera abiotiska och biologiska tillstånd i sjöar.

*Nyckelord:* *Chironomus riparius*, stabila isotoper, trofisk fraktionering, klimatförändring, oligotrofiering

## Abstract

The fastest and the greatest change in average air temperature is expected in the North and South Pole. As a result, when air temperature rises so do the water temperature and a change in vegetation can be seen. This could be the reason for the nutritional depletion that occurs in many Arctic lakes. However, the cause of oligotrophication has not been clarified. A research group at the Swedish University of Agricultural Sciences studies how the Arctic freshwater ecosystems are affected by oligotrophication as a result of climate change. Stable isotopes of carbon (C) and nitrogen (N) are often used when studying nutrient flows and food webs in ecosystems. The composition of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in aquatic organisms increases with 0,8‰ and 3,4‰ respectively for each trophy level. The difference in the isotopic composition between an animal and its diet is called trophic fractionation. In this study, the aquatic larvae of *Chironomus Riparius* (*C. riparius*) is cultured with three different food sources (Alder leaf, TetraMin® and *Chlorella* sp.) in three different temperatures (15 °C, 18 °C and 23 °C). The aim is to examine the influence of temperature on trophic fractionation of C and N in the plant-consumer interference. The results will help the research group to interpret paleolimnological data, such as sediment cores from Arctic lakes. An isotopic analysis of subfossils in the sediment cores, for example headcapsules from *C. riparius*, can be used to reconstruct weather conditions and species composition in lakes thousands of years back in time. This can help researchers to predict and anticipate the ecological effects of climate change.

In this study the trophic fractionation was calculated with two different outcomes: in one calculation the isotopic composition in the fresh food was used and in the other calculation the isotopic composition of the accumulated food was used. The results show that temperature has a significant effect on the  $^{13}\text{C}$ -fractionation in *C. riparius* that were fed with TetraMin®, in both outcomes, were the  $^{13}\text{C}$ -fractionation decreased with increasing temperature. However, it is likely that the lipid content in *C. riparius* causes the correlation between the  $^{13}\text{C}$ -fractionation and temperature. After a mathematical lipid normalization the affect of temperature on the  $^{13}\text{C}$ -fractionation can not be seen. The temperature does not affect the  $^{15}\text{N}$ -fractionation in *C. riparius* fed with TetraMin®. Isotopic data of larvae fed with *Chlorella* sp. were only obtained from two temperatures and the standard deviation was high. Hence no conclusions from these data are taken. In the treatment with alder leaves as a food source the mortality was 100 % and therefore values are missing. With the results of this study, it is considered that the isotopic composition in the

accumulated food should be used in fractionation calculations, due to that the accumulated food is more likely to reflect the isotopic composition under natural conditions. A lipid normalization should also be made since the lipid content can lead to misinterpretations. The conclusion is that when analyzing paleolimnological samples there is no need to correct for temperature in isotopic analyses in order to reconstruct abiotic and biological conditions in lakes.

*Keywords:* *Chironomus riparius*, stable isotopes, trophic fractionation, climate change, oligotrophication

# Innehållsförteckning

	<b>Förkortningar</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Introduktion</b>	<b>3</b>
1.1	Bakgrund	3
1.2	Syfte	5
<b>2</b>	<b>Material och metod</b>	<b>7</b>
2.1	Förberedelser och försöksdesign	7
2.2	Praktiskt genomförande	7
2.3	Preparering av prover	8
2.4	Isotopanalys	8
<b>3</b>	<b>Resultat</b>	<b>10</b>
3.1	Isotopsammansättning av C och N i TetraMin®, <i>Chlorella</i> sp. och allöv	10
3.2	Isotopsammansättningen av C och N i <i>C. riparius</i>	12
3.3	<sup>13</sup> C- och <sup>15</sup> N-fraktionering i <i>C. riparius</i>	15
3.3.1	<sup>13</sup> C-fraktionering	15
3.3.2	<sup>15</sup> N-fraktionering	16
3.3.3	<sup>13</sup> C-fraktionering och C/N-kvot	18
3.3.4	Medelvärden ± standardavvikelse av <sup>13</sup> C- och <sup>15</sup> N-fraktioneringar	20
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>21</b>
4.1	Metodval	21
4.2	Isotopsammansättning i födotyperna och i <i>C. riparius</i>	21
4.3	<sup>13</sup> C- och <sup>15</sup> N-fraktionering i <i>C. riparius</i>	22
4.4	Lipidnormaliserade <sup>13</sup> C- och <sup>15</sup> N-fraktioneringar i <i>C. riparius</i>	23
<b>5</b>	<b>Slutsats</b>	<b>25</b>
	<b>Referenslista</b>	<b>26</b>
	<b>Tack</b>	<b>30</b>





## Förkortningar

ANOVA	Analysis of variance (variansanalys)
EA-IRMS	Elemental Analyzer – Isotope Ratio Mass Spectrometer
$^i\text{C}$	Kolisotop, $i$ anger masstal ( $\Sigma$ av antalet protoner och neutroner i en atomkärna)
$\delta^{13}\text{C}$	Värdet anger isotopsammansättningen mellan $^{13}\text{C}$ och $^{12}\text{C}$
$^i\text{N}$	Kväveisotop, $i$ anger masstal ( $\Sigma$ av antalet protoner och neutroner i en atomkärna)
$\delta^{15}\text{N}$	Värdet anger isotopsammansättningen mellan $^{15}\text{N}$ och $^{14}\text{N}$



# 1 Introduktion

## 1.1 Bakgrund

På Nord- och Sydpolen förväntas temperaturhöjningen både bli större och gå fortare (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). Detta visar sig exempelvis i Arktis där medeltemperaturen i regionen har ökat dubbelt så mycket sedan år 1980 än vad den har på andra områden på jorden (SWIPA, 2011). En förklaring till detta är så kallade positiva återkopplingar. Det är processer som förstärker klimatförändringens påverkan ett exempel på en av dessa är is- och snöavsmältningen, där en ökad temperatur leder till att is och snö avsmälter i större omfattning. När den mörkare ytan under is- och snötäcket framträder minskar albedot, som är ett mått på en ytas reflektionsförmåga. En mörkare yta reflekterar solens strålar mindre effektivt och det resulterar i att temperaturhöjningen istället amplifieras då värmen i större utsträckning absorberas (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). Som en följd av pågående klimatförändring stiger vattentemperaturen i sjöar. Vatten har egenskapen att absorbera och lagra stora mängder värme vilket gör att vatten kan fungera som en stöddämpare för temperaturstigningen i luften (Lampert & Sommer, 1997).

Arktiska sjöar klassificeras ofta som oligotrofa (närlingsfattiga) eller ultra-oligotrofa. Det innebär att den naturliga totalfosforkoncentrationen i dessa sjöar är mindre än 5–10 respektive  $<5$   $\mu\text{g}$  per liter (Lampert & Sommer, 1997). Miljöövervakningsdata över de svenska arktisk-alpina sjöarna visar att totalfosforhalten minskar, vilket innebär att dessa sjöar blir alltmer oligotrofa (Goedkoop & Angeler, 2011). Denna trend syns även i finska (Arvola *et al.*, 2011) och kanadensiska (Quinlan *et al.*, 2008) sjöar och de bakomliggande orsakerna till fenomenet har inte klarlagts (Goedkoop & Angeler, 2011). Oligotrofieringen i arktiska sjöar kan bero på att näringen i större utsträckning blir otillgänglig för primärproduktionen. Med vattnet som en stöddämpare för temperaturökningen, absorberar ytvattnet allt mer värme och temperaturskillnaden mellan den övre (epilimnion) och den nedre (hypolimnion) vattenkolumnen blir allt större. Detta leder till att det

behöver ske en större temperaturutjämning för att vattenmassorna ska omblandas och kan resultera i att en sjö förblir stratifierad under en längre period jämfört med tidigare (Adrian *et al.*, 2009). Det kan resultera i att näring som frigjorts från sedimenten blir otillgänglig för primärproduktionen eftersom epilimnion och hypolimnion inte har något utbyte under stratifikationen (Lampert & Sommer, 1997). Dock beror fenomenet troligtvis på en kombination av olika klimatbetingade förändringar. Exempelvis möjliggör varmare temperaturer kolonisering av vegetation som tidigare inte klarat av väderförhållandena (Dicks *et al.*, 2013). I en kanadensisk studie påvisas en minskad totalfosforkoncentration i tillrinnande vatten (Eimers *et al.*, 2009), dessa i kombination kan tyda på att vegetation tar upp delar av näringen som tidigare nått sjön med ytavrinningen (Bondesson, 2017).

En forskningsgrupp på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) undersöker hur arktiska sötvattensjöar och dess ekosystem långsiktigt påverkas av oligotrofieringen som ett resultat av klimatförändringen. Genom att ta sedimentproppar kan paleolimnologisk information såsom tidigare väderförhållanden, näringshalt och artsammansättning i sjöar rekonstrueras. Beroende på sedimentprovets djup eller längd, kan dessa abiotiska och biologiska faktorer rekonstrueras flera hundra till tusentals år tillbaka i tiden (Leavitt *et al.*, 2009). Isotopdatering av sedimentskikt i kombination med isotopanalyser av fossila lämningar som inlagrats i sedimenten kan vattentemperaturer exempelvis rekonstrueras (Birks, 1995) och dessa prover kan hjälpa forskare att tyda och förutse de ekologiska effekterna av pågående klimatförändring (Adrian *et al.*, 2009).

Stabila isotoper av kol (C) och kväve (N) används för att undersöka trofiska interaktioner i ekosystem (Fry, 2008). Både kol och kväve har minst två stabila isotoper,  $^{12}\text{C}$  respektive  $^{13}\text{C}$ , där  $^{13}\text{C}$  står för 1,1 % (Grover *et al.*, 2016) och  $^{14}\text{N}$  respektive  $^{15}\text{N}$ , där  $^{15}\text{N}$  för 0,37 % av de totala kol- och kväveformerna i naturen (Owens, 1988). Trots att de tyngre isotopformerna av kol ( $^{13}\text{C}$ ) och kväve ( $^{15}\text{N}$ ) är mindre förekommande, är de betydelsefulla när födovävar studeras då de bär med information om näringsflöden inom ekosystem (Palo, 1995). Isotopsammansättningen ( $\delta$ ) hos en organism brukar anges som en kvot mellan den tyngre och lättare isotopen, vilken relateras till en standard för det givna atomslaget. Under djurens metabolism sker en diskriminering gentemot  $^{13}\text{C}$  och  $^{15}\text{N}$  som följaktligen anrikas i vävnaden och längs näringskedjan (Fry, 2008), där  $\delta^{13}\text{C}$  indikerar på födokällan och  $\delta^{15}\text{N}$  på trofinivå. Skillnaden i  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  mellan en organism och dess föda kallas för trofisk fraktionering ( $\Delta\delta$ ) (Jones *et al.*, 1998).

I en studie av Minagawa & Wada (1984) påvisades en genomsnittlig  $^{13}\text{C}$ -fraktionering ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ) respektive  $^{15}\text{N}$ -fraktionering ( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ ), där  $\delta^{13}\text{C}$  ökar med 0,8 ‰ och  $\delta^{15}\text{N}$  med 3,4 ‰ för varje trofinivå hos akvatiska organismer. Den trofiska fraktioneringen utgör ett medelvärde av alla samlade fraktioneringar som sker på atomnivå, såväl som under djurens metabolism (Fry, 2008). Dessa medelvärden av Minagawa & Wada (1984) använder

forskare utan att de bakomliggande orsakerna eller faktorer som kan påverka diskrimineringen är fullt förstådda (Masclaux & Richoux, 2017). I en studie av Post (2002) visar resultaten att  $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen kan variera allt från -3 till 4 ‰ respektive 0,5 till 5,5 ‰ mellan olika akvatiska organismer.

Temperaturen varierar både i tid och rum vilket gör den till en av de viktigaste abiotiska faktorerna i ekosystem. Huruvida temperaturen har en inverkan på fraktioneringen är inte känt och det är endast ett fåtal studier som införlivat temperaturen som en påverkansfaktor. Faktorer såsom födokvalité och lipidinnehåll har fått större uppmärksamhet inom forskningen som bedrivs kring trofisk fraktionering (Masclaux & Richoux, 2017). I denna studie kultiveras fjädermygglarven *Chironomus riparius* (*C. riparius*) som är en vanlig detritusätare i sjöar, även i arktiska (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). Akvatiska evertetrater, såsom *C. riparius*, är ektoterma vilket innebär att den omgivande temperaturen reglerar kroppsvärmen och därmed påverkas även djurens fysiologiska och biokemiska processer. En högre vattentemperatur påskyndar den kemiska reaktionshastigheten, då vattnet innehåller mer energi i form av värme (Lampert & Sommer, 1997).  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen kan påverkas av födointag och/eller temperatur, vilka delvis styr tillväxthastigheten i akvatiska djur. Den lättare kväveisotopen ( $^{14}\text{N}$ ) kan i högre grad anrikas i vävnaden vid ett snabbare födointag och/eller vid högre temperaturer, där förklaringen kan vara en mindre exkretion under djurets omsättning av födan under dessa betingelser (Barnes *et al.*, 2007).

*C. riparius* lever både i vatten och i luften under sin livstid. De fyra första stadierna är akvatiska och det är under dessa *C. riparius* är en sedimentlevande larv, därefter övergår larven i puppstadiet för att slutligen bli en luftlevande adult fjädermygga (Péry *et al.*, 2002). Fjädermygglarvsskallar som inlagrats i sedimenten kan sedan användas i paleolimnologiska studier för att rekonstruera vattentemperaturer i sjöar (Birks, 1995).

## 1.2 Syfte

Temperaturens möjliga inverkan på trofisk fraktionering kan leda till feltolkningar i kartläggningen av näringsflöden och näringsvävar. Syftet med denna studie är att undersöka *om* och möjligen *vilken* inverkan temperatur har på den trofiska fraktioneringen av C och N i näringskedjan mellan växt och konsument i sötvattenekosystem. Resultaten från studien ska bidra med mer kunskap gällande vilka faktorer som kan påverka diskrimineringen, samt hjälpa forskningsgruppen på SLU att tolka paleolimnologiska data från fryskonserverade fiskvävnadsprover och från sedimentproppar tagna ur arktiska sjöar.

För att testa temperaturens inverkan på fraktioneringen genomfördes ett laboratorieförsök med kultiverade fjädermygglarven *C. riparius* (Diptera, Chironomiade). *C. riparius* är en vanlig modellorganism, dessutom är *Chironomus* ssp. en vanligt förekommande art i sötvattensjöar, även i arktiska och utgör en del av födobasen hos djur högre upp i näringskedjan (Vincent & Laybourn-Parry, 2008). *C. riparius* kultiverades med tre olika födokällor. Följande födokällor valdes för att de har olika födokvalité (C/N-kvot) och kan representera föda som *C. riparius* äter in vivo; terrestra löv från al (*Alnus* sp.), encelliga akvatiska grönalger (*Chlorella* sp.) och TetraMin<sup>®</sup> som är ett akvariefoder för sötvattensfiskar. I tre olika temperaturer; 15°C, 18°C och 23°C kultiverades *C. riparius* med födotyperna.

I studien ställs följande frågeställningar:

- Förändras isotopsammansättningen av C och N i jämförelsen mellan ”färsk föda” och det organiska materialet som ansamlats i sandsubstratet (”ansamlad föda”)?
- Skiljer sig <sup>13</sup>C- och <sup>15</sup>N-fraktioneringen i *C. riparius* med födotyp och temperatur?
- Har temperaturen en inverkan på den trofiska fraktioneringen av <sup>13</sup>C och <sup>15</sup>N i *C. riparius*?

Temperaturen kan ha en inverkan på <sup>13</sup>C- eller <sup>15</sup>N-fraktioneringarna då *C. riparius* är ektoterm, dock är hypotesen att fraktioneringarna inte påverkas av temperatur. Detta för att lättare och tyngre isotopers kemiska bindningar väntas bildas och brytas i samma proportion oavsett temperaturen. Dock tros fraktioneringarna gå fortare med stigande temperatur. Isotopsammansättning av C och N mellan ”färsk” och ”ansamlad” föda väntas skilja sig eftersom det sker en mikrobiell nedbrytning och det förmodas att födokvalité och ursprung (födotyp) har inverkan på fraktioneringen. Födokvalité och ursprung styr hur väl fjädermygglarverna kan tillgodogöra sig födan. Larverna förväntas tillväxa fortast med TetraMin<sup>®</sup> i alla temperaturer, då det består av en blandning av bland annat blötdjur, spannmål, alger, socker och fett (Tetra u.å.) vilket gör TetraMin<sup>®</sup> till en födokälla av hög kvalité. Larverna antas växa långsammast med allöv, då terrestra växter har cellväggar vilka kan vara svåra för larverna att bryta ned.

## 2 Material och metod

### 2.1 Förberedelser och försöksdesign

Äggpaket från *C. riparius* insamlades från en odlingskultur. Innan kläckning förbereddes 36 stycken 900 ml kristallisationsskålar vilka fylldes till en fjärdedel med akvariesand och till tre fjärdedelar med vatten med en hårdhet av 8 °dH (Uppsala vatten, 2017). I vardera klimatkammare, med en temperatur av 15°C, 18°C respektive 23 °C, placerades 12 kristallisationsskålar randomiserat, fyra replikat av varje födotyp. Samtliga skålar hade en konstant syrgastillförsel, där storleken på gasbubblorna begränsades av en glaspipett på luftslangens ände. TetraMin® och torkade allöv maldes till ett finare pulver och sållades genom en 0,50 mm sil. Mängder motsvarande två dagars föda tillsattes skålarna, med avseende på en tillförsel av 0,4 mg C per larv och dag samt på approximationen av kolhalten i respektive föda (se appendix a). Detta för att få igång mikrobiell aktivitet innan larverna introducerades.

### 2.2 Praktiskt genomförande

När äggen nått sitt första larvstadium överfördes 15–17 nykläckta larver till varje skål, vilka erhållit temperaturen i vardera klimatkammare. Larverna introducerades till kristallisationsskålarna, från den lägsta till den högsta temperaturen i samtliga replikat, i takt med kläckningen. Hädanefter tillfördes föda under måndagar, onsdagar och fredagar. En gång i veckan ersattes en tredjedel av vattenvolymen med nytt vatten och skålarna fylldes även på vart efter vatten evaporerat. Genom försöket hölls vattentemperaturen konstant i skålarna, då temperaturens inverkan på fraktioneringen var den eftersökta variabeln. Vattnet som tillsattes skålarna under försöket togs ur behållare som stått i samma klimatkammare som respektive skål och hade därmed samma

temperatur. Klimatkammarna var inställda på ett intervall med 16:8 timmar ljus respektive mörker för att efterlikna de naturliga ljusförhållandena.

## 2.3 Preparering av prover

Försöket avbröts när larverna uppnått det fjärde stadiet, i ett eller i flera av replikaten för en födotyp. Samtliga larver från varje replikat placerades i enskilda bägare med vatten under minst 12 timmar för att tömma maginnehållet, då endast C och N som lagrats in i kroppsvävnaden var av intresse. Larvernas torrsvikt erhöles efter torkning i laboratorieugnar med 55–60 °C, varpå larvbiomassan för varje replikat förvarades i tillslutna behållare i ett frysrum med en temperatur av -20 °C. Födan som ansamlats i kristallisationsskålarna filterades med en vattenpump genom Whatman® GF/C glasmikrofiberfilter med en effektiv storlek av 1,2 µm. Torrsvikten för födomassan erhöles och förvarades enligt ovanstående metod.

## 2.4 Isotopanalys

När försöket i alla klimatkammare var klara maldes larverna från samma replikat till ett homogent pulver. 0,5 mg ± 10 % av larvbiomassan samt 1,0 mg av födomassan vägdes upp i tennkapslar (Elemental microanalysis 5 x 3,5 mm) som därefter förslöts väl. På Sveriges lantbruksuniversitet i Umeå genomfördes en masspektrometrianalys av proverna med EA-IRMS av Jonas Lundholm och Jenny Ekman (Flash EA 2000, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany & DeltaV, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Masspektrometrianalysen gav isotopsammansättningen av C och N (‰) i *C. riparius* och i de olika födotyperna. Beräkningar för isotopsammansättningen redovisas i ekvation 1 (Fry, 2008), där Z anger atomslaget,  $\delta^{iH}$  och  $\delta^{iL}$  betecknar isotopen med större respektive lägre masstal. Genom masspektrometrianalysen erhöles även C/N-kvoten i fjädermygglarverna och i de olika födotyperna.

$$\delta^{iH}Z = \left( \frac{\left( \frac{\delta^{iH}Z}{\delta^{iL}Z} \right)_{prov}}{\left( \frac{\delta^{iH}Z}{\delta^{iL}Z} \right)_{standard}} - 1 \right) \times 1000 (\text{‰}) \quad (\text{ekv. 1}).$$

Isotopsammansättningen för C respektive N användes för att beräkna den trofiska fraktioneringen (Ekvation 2) (Fry 2008).  $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar beräknades i två olika utfall med  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  i färsk respektive ansamlad föda. För att avgöra om temperaturen har en signifikant påverkan på trofisk fraktionering utfördes en ”tvåvägs” ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) se appendix b. Denna typ av variansanalys gör temperaturen till en kontinuerlig oberoende



variabel mot vilka de två beroende variablerna, fraktioneringen och födotyp testas. Detta gör att temperaturgradientens möjliga inverkan på fraktioneringen i kombination med födotyperna kan påvisas. ANOVA ger ett p-värde för varje födotyp vilket anger om temperaturen har en signifikant påverkan på fraktioneringen ( $p \leq 0,05$ ).

$$\Delta\delta = \delta_{\text{larv}} - \delta_{\text{föda}} \quad (\text{ekv. 2})$$

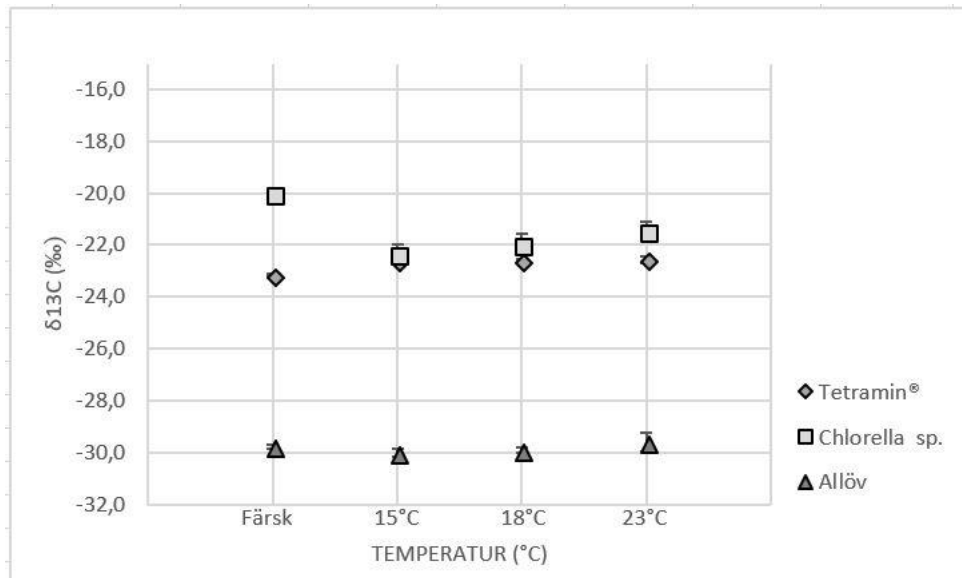
## 3 Resultat

### 3.1 Isotopsammansättningen av C och N i TetraMin<sup>®</sup>, *Chlorella* sp. och allöv

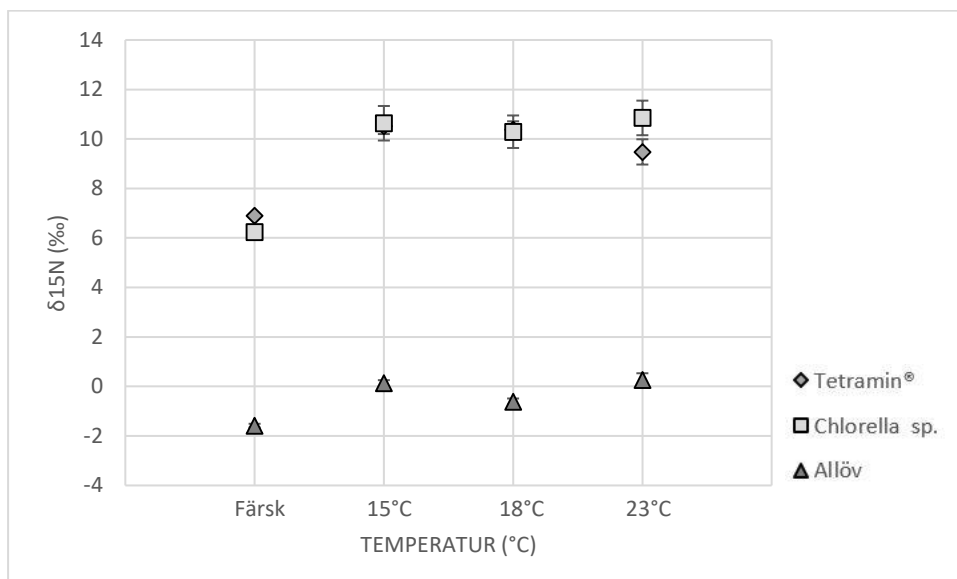
$\delta^{13}\text{C}$  (‰) och  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) i den färska födan (färsk) som tillfördes *C. riparius* utgör grunden för följande  $\delta$ -värden i ansamlad föda och i larverna samt i beräkningarna för de trofiska fraktioneringarna.

Mellan den färska och den ansamlade födan är  $\delta^{13}\text{C}$  nästintill oförändrad i allöv och TetraMin<sup>®</sup>. Hos allöven ökar  $\delta^{13}\text{C}$  med temperaturen i genomsnitt med 0,05 ‰, i jämförelsen mellan färsk och ansamlad föda. Hos TetraMin<sup>®</sup> minskar  $\delta^{13}\text{C}$  med stigande temperatur med -0,62 ‰, i jämförelsen med färsk och ansamlad föda. I *Chlorella* sp. ökar  $\delta^{13}\text{C}$  mellan färsk och ansamlad föda vid 15°C med 1,94 ‰, därefter minskar  $\delta^{13}\text{C}$  med stigande temperatur med -0,88 ‰ (Figur 1a & b).

$\delta^{15}\text{N}$  i TetraMin<sup>®</sup> och *Chlorella* sp. ökar i samtliga temperaturer, i jämförelse med  $\delta^{15}\text{N}$  i respektive färsk föda. I genomsnitt ökar  $\delta^{15}\text{N}$  i TetraMin<sup>®</sup> med 3,24 ‰ och  $\delta^{15}\text{N}$  i *Chlorella* sp. 4,35 ‰.  $\delta^{15}\text{N}$  i allöv avtar i medel med 1,18‰ mellan färsk och ansamlad föda (Figur 1a & b).



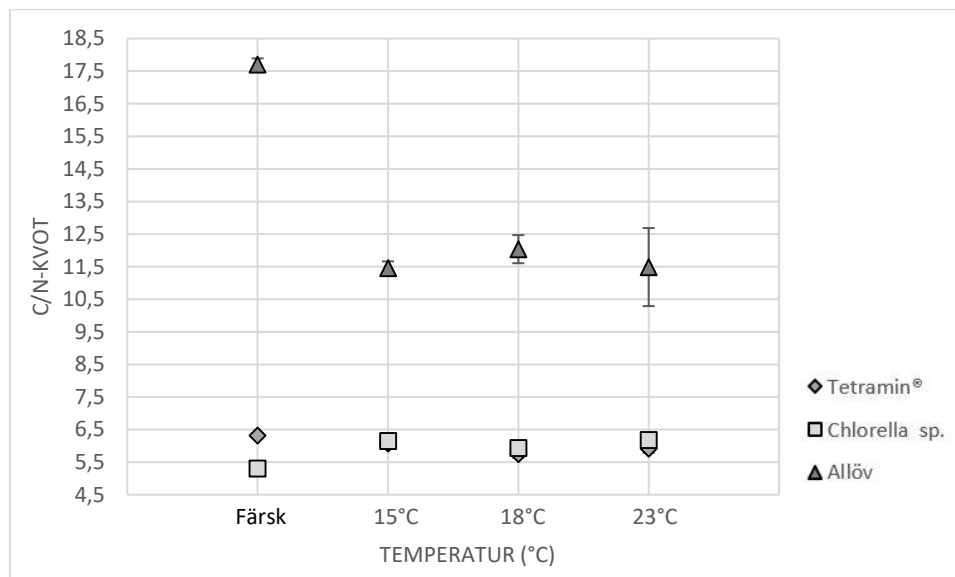
Figur 1a.  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) i färsk och ansamlad föda i 15 °C, 18°C och 23°C. De grå tetragonerna (TetraMin®), de ljusgrå kvadraterna (Chlorella sp.) och de mörkgrå trianglarna (allöv) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.



Figur 1b.  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) i färsk och ansamlad föda i 15 °C, 18°C och 23°C. De grå tetragonerna (TetraMin®), de ljusgrå kvadraterna (Chlorella sp.) och de mörkgrå trianglarna (allöv) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

C/N-kvoten i TetraMin® och Chlorella sp. mellan färsk och ansamlad föda varierar men förblir relativt stabil genom temperaturerna. En genomsnittlig minskning av -0,41 ‰ sker hos TetraMin® och en genomsnittlig ökning på 0,78 ‰ hos Chlorella sp. C/N-kvoten avtar markant i allöv mellan färsk och

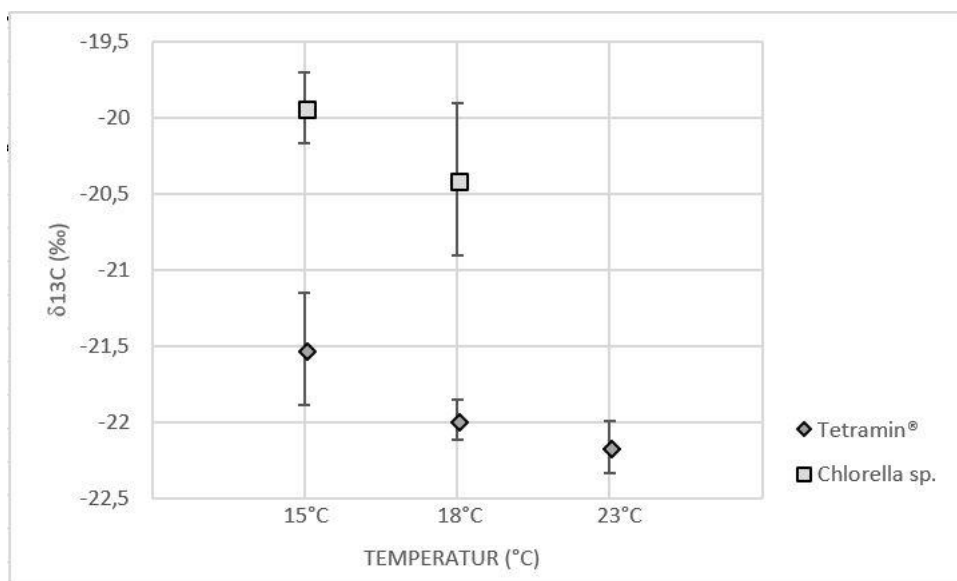
ansamlad föda i 15°C med -6,25 %, sedan förblir den genomsnittliga C/N-kvoten genom de olika temperaturerna stabil ( $\pm 0$ ) (Figur 2).



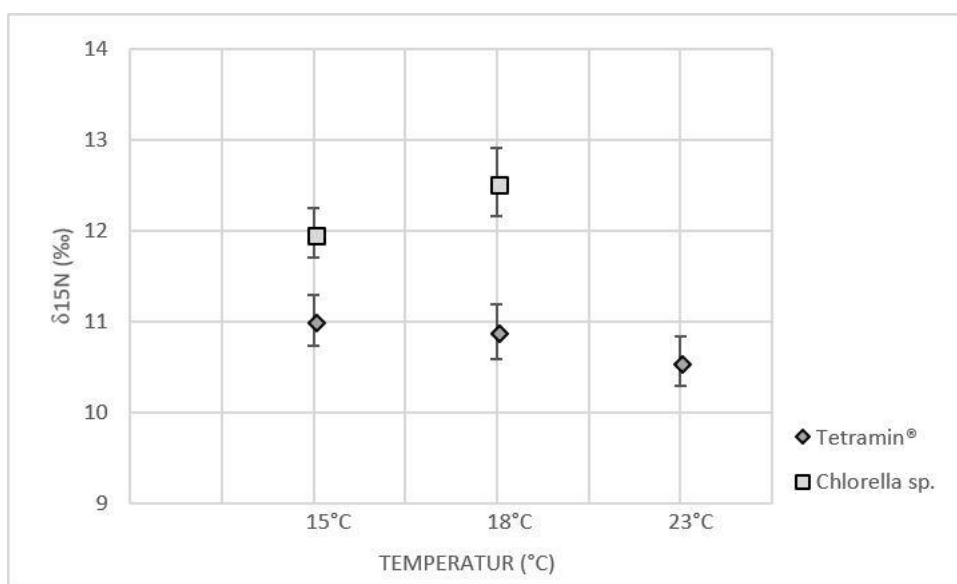
Figur 2. C/N-kvoten i färsk och ansamlad föda. De grå tetragonerna (TetraMin®), de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) och de mörkgrå trianglarna (allöv) med tillhörande felstaplar anger medelvärde  $\pm$  standardavvikelsen.

### 3.2 Isotopsammansättningen av C och N i *C. riparius*

$\delta^{13}\text{C}$ -,  $\delta^{15}\text{N}$ -värden och C/N-kvoter i *C. riparius* erhöles endast från försöken med TetraMin® och *Chlorella* sp. som födokälla. I försöket med allöv var dödligheten för hög för att erhålla prover för isotopanalys och därmed saknas mätvärden. Med TetraMin® erhöles larver från samtliga temperaturer medan det i försöket *Chlorella* sp. endast erhöles från två temperaturer, 15°C och 18°C. Försöket hade överlag en relativt hög dödlighet (se appendix c).  $\delta^{13}\text{C}$ - och  $\delta^{15}\text{N}$ -värdena i *C. riparius* som kultiverats med TetraMin® är relativt oförändrade genom de olika temperaturerna. Det kan anas att  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  svagt avtar med -0,64 ‰ respektive -0,44 ‰ med stigande temperatur. Med *Chlorella* sp. som födokälla är  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  relativt oförändrade genom de olika temperaturerna.  $\delta^{13}\text{C}$  avtar svagt med 0,47 ‰ och  $\delta^{15}\text{N}$  ökar svagt med 0,55 ‰ med stigande temperatur (Figur 3a & b).

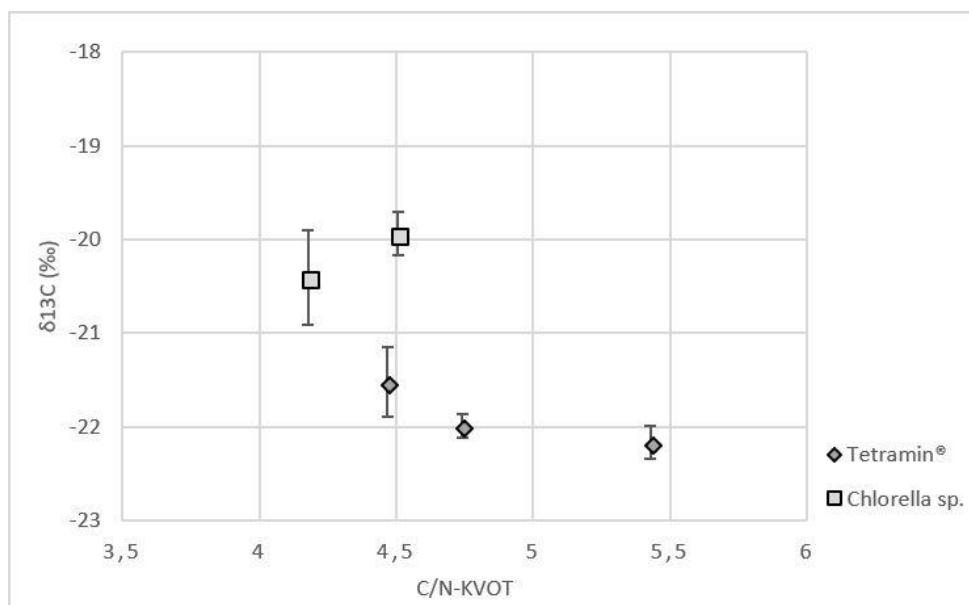


Figur 3a.  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) i *C. riparius* i förhållande till födotyp och temperatur. De grå tetrakoterna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

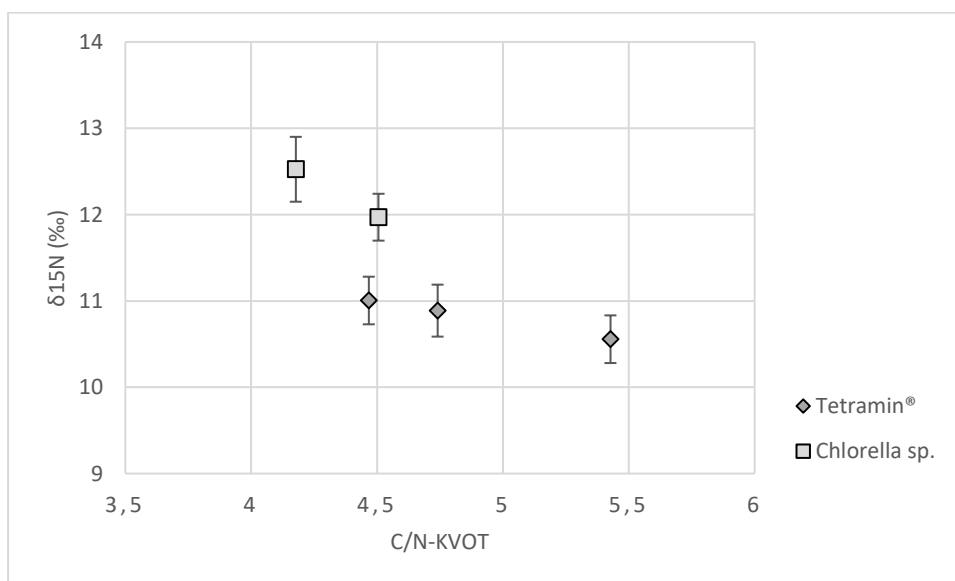


Figur 3b.  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) i *C. riparius* i förhållande till födotyp och temperatur. De grå tetrakoterna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

Med TetraMin® som födokälla avtar  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  svagt med -0,64 ‰ respektive -0,44 ‰ med stigande C/N-kvot. Med *Chlorella* sp. som födokälla ökar  $\delta^{13}\text{C}$  med -0,47 ‰ och  $\delta^{15}\text{N}$  avtar svagt -0,56 ‰ med stigande C/N-kvot (Figur 4a & b).



Figur 4a.  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) i *C. riparius* i förhållande till födotyp och C/N-kvoten i fjädermygglar- verna. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med till- hörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.



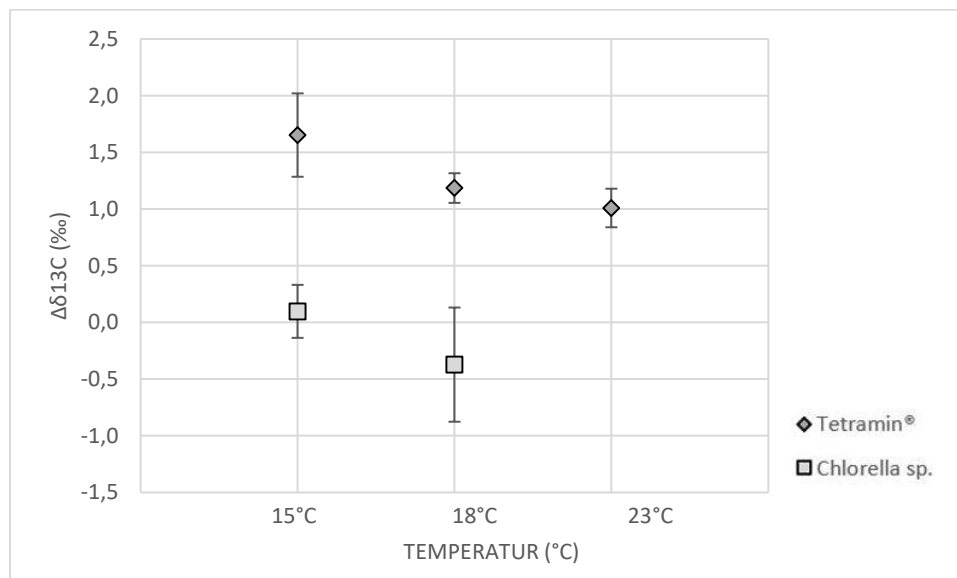
Figur 4b.  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) i *C. riparius* i förhållande till födotyp och C/N-kvoten i fjädermygglar- verna. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med till- hörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen av

### 3.3 $^{13}\text{C}$ - och $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar i *C. riparius*

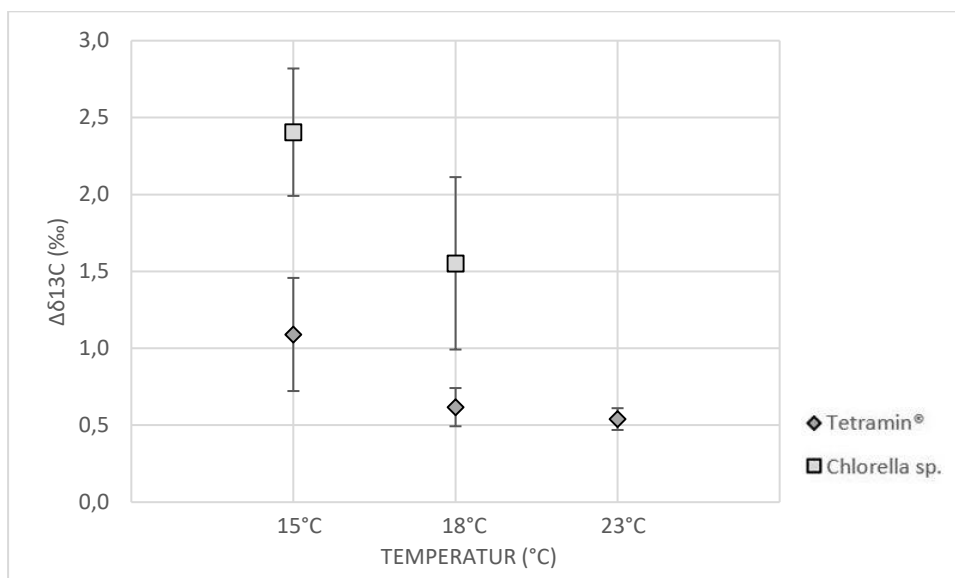
Fjärdermygglarverna som matats med TetraMin<sup>®</sup> och *Chlorella* sp. visar att temperaturen har en påverkan på  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen beräknat på både färsk och ansamlad föda (appendix b).

#### 3.3.1 $^{13}\text{C}$ -fraktionering

*C. riparius* som kultiverats med TetraMin<sup>®</sup> visar en signifikant avtagande trend i  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen med stigande temperatur. Denna trend finns i båda utfallen där  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen avtar med 0,65 ‰ med färsk föda ( $p=0,04$ ) och med 0,56 ‰ med ansamlad föda ( $p=0,02$ ) (Figur 5a & b).  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen visar även en signifikant avtagande trend i de fjärmygglarver som kultiverats med *Chlorella* sp. I beräkningar med ansamlad föda avtar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen signifikant med 0,86 ‰ ( $p < 0,001$ ), trenden är även avtagande i fallet med färsk föda, dock ökar fraktioneringen signifikant med -0,47 ‰ ( $p < 0,001$ ) med stigande temperatur (Figur 5a & b).



Figur 5a.  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen (‰) i *C. riparius*, räknat med **färsk föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin<sup>®</sup>) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

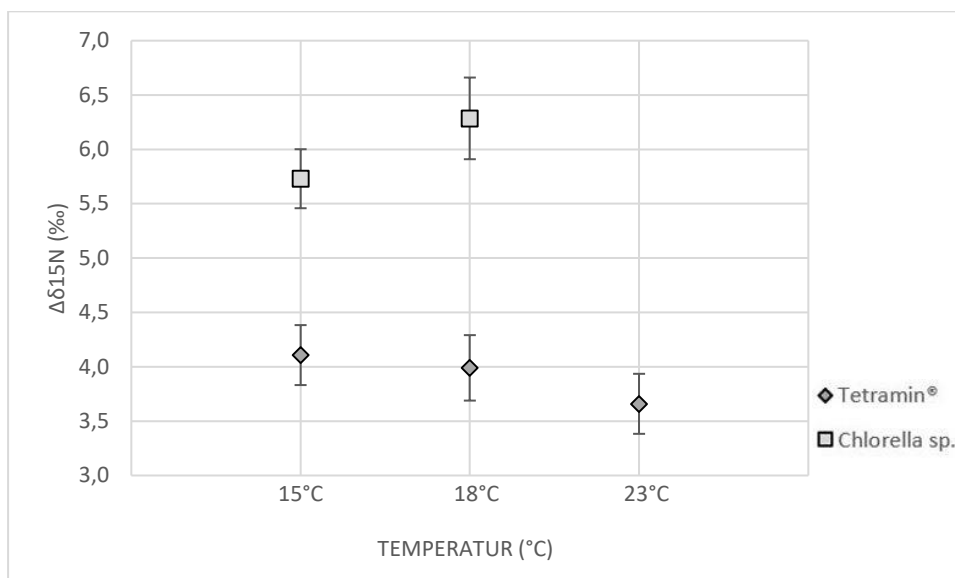


Figur 5b. <sup>13</sup>C-fraktioneringen (‰) i *C. riparius*, räknat med **ansamlad föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet ± standardavvikelsen.

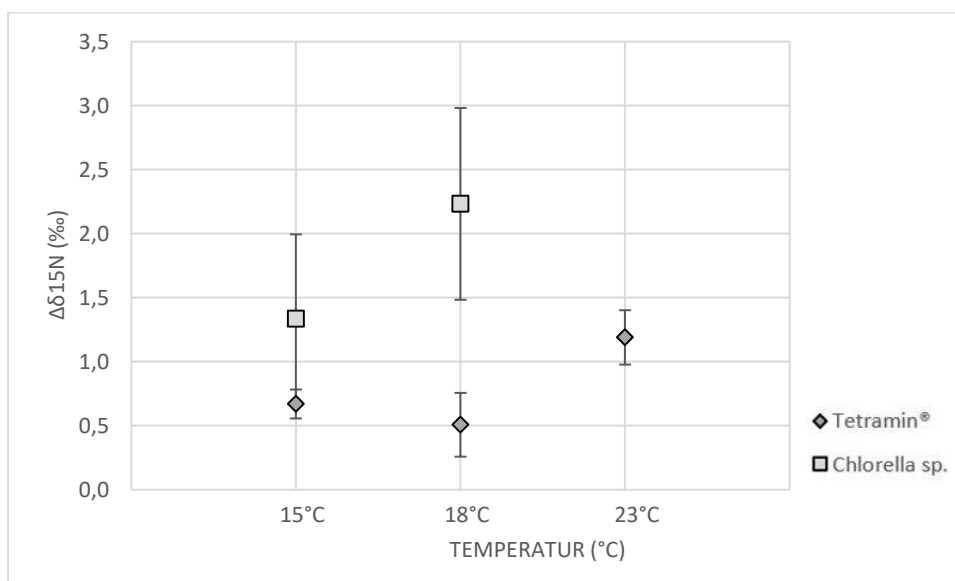
### 3.3.2 <sup>15</sup>N-fraktionering

Temperaturen visar ingen signifikant påverkan på <sup>15</sup>N-fraktioneringen med TetraMin® som födokälla. <sup>15</sup>N-fraktioneringen med färsk föda avtar med -0,45 ‰ (p=0,25) och med ansamlad föda är fraktioneringen som störst vid 23 °C (Δδ<sup>15</sup>N=1,19) och som lägst 18°C (Δδ<sup>15</sup>N=0,51) (p=0,16) (Figur 6a & b). <sup>15</sup>N-fraktioneringen med *Chlorella* sp. som födokälla visar temperaturen en signifikant påverkan. <sup>15</sup>N-fraktioneringen visar en ökande trend med temperaturen, där fraktioneringen med färsk föda ökar med 0,56 ‰ (p=0,03) och med 0,9 ‰ med ansamlad föda (p=0,03) (Figur 6a & b).





Figur 6a.  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen (‰) i *C. riparius* räknat med **färsk föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

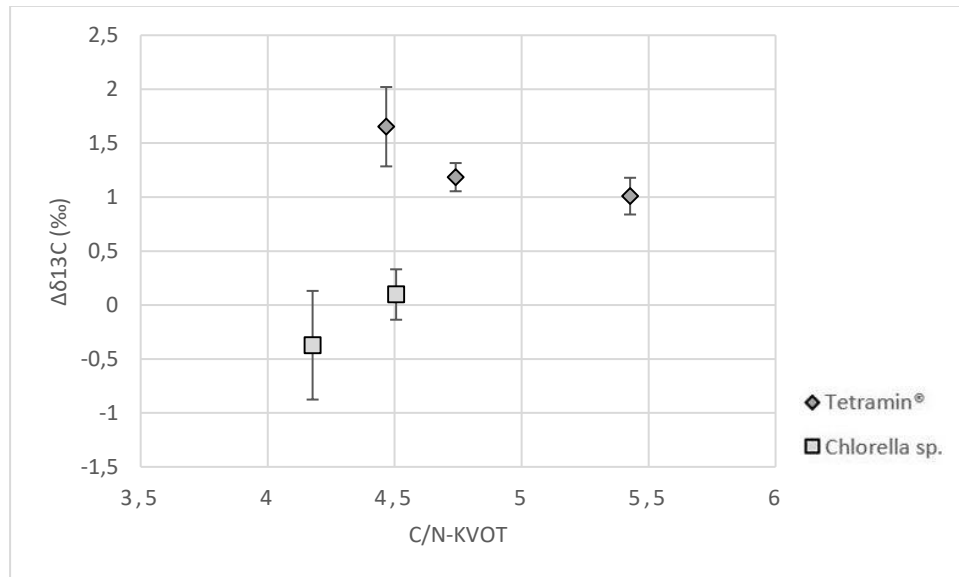


Figur 6b.  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen (‰) i *C. riparius*, räknat med **ansamlad föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

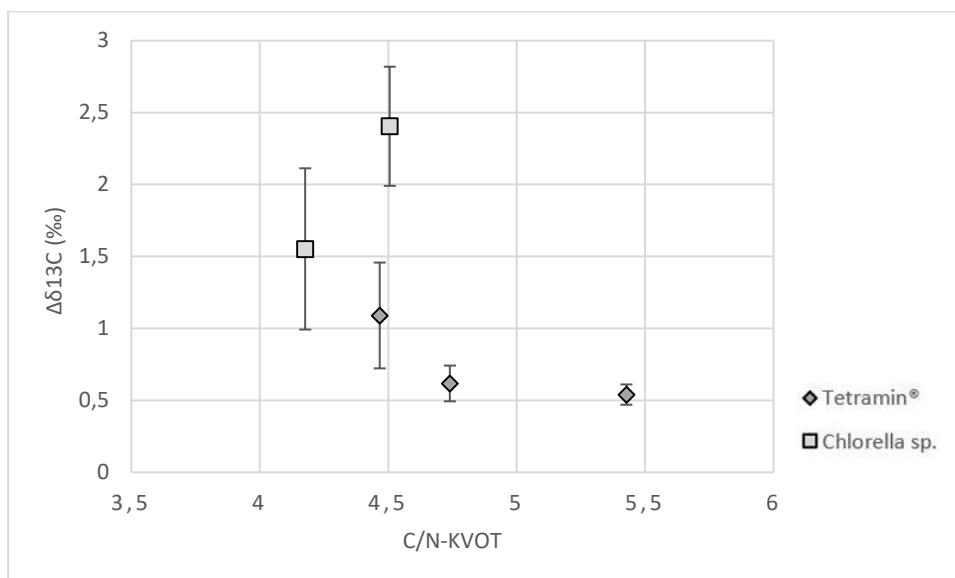
### 3.3.3 $^{13}\text{C}$ -fraktionering och C/N-kvot

I denna studie påvisas även att  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen hos larver som ätit TetraMin<sup>®</sup> avtar med en högre C/N-kvot i larverna, i båda utfallen med färsk ( $\Delta\delta^{13}\text{C}=-0,65\text{‰}$ ) och ansamlad föda ( $\Delta\delta^{13}\text{C}=-0,55\text{‰}$ ). Hos larver som ätit *Chlorella* sp. ökar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen med avtagande C/N-kvot ( $\Delta\delta^{13}\text{C}=0,46$ ) beräknat med färsk föda, medan  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen ökar med stigande C/N-kvot ( $\Delta\delta^{13}\text{C}=0,86$ ) beräknat med ansamlad föda (Figur 7a & b).

I en studie av Post *et al.* (2007) rekommenderas en matematisk normalisering av lipider hos akvatiska organismer med en  $\text{C/N}>3,5$ . Då  $\text{C/N-kvoten}>4,17$  i larverna utförs lipidnormaliseringen för att undersöka om temperaturens inverkan på fraktioneringen kan vara orsakad av lipidhalten i larverna.

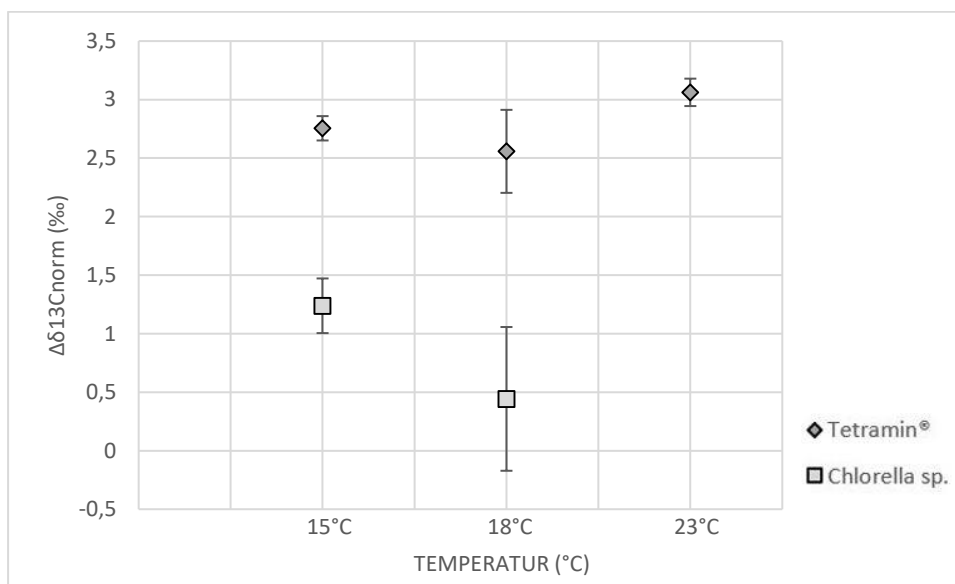


Figur 7a.  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen (‰) i *C. riparius* räknat med **färsk föda**, i förhållande till C/N-kvot i larverna. De grå tetragerarna (TetraMin<sup>®</sup>) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.



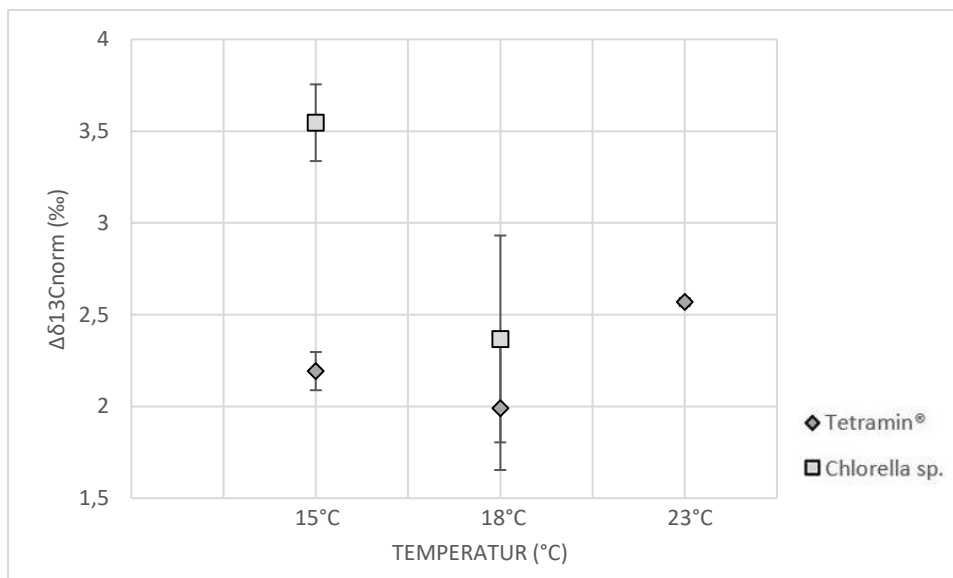
Figur 7b. <sup>13</sup>C-fraktioneringen (‰) i *C. riparius* räknat med **ansamlad föda**, i förhållande till C/N-kvoten i larverna. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet ± standardavvikelsen.

Efter lipidnormaliseringen av <sup>13</sup>C-isotopfraktioneringen ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) med TetraMin® som födokälla har temperaturen ingen signifikant påverkan i något av utfallen med färsk ( $p=0,88$ ) respektive ansamlad föda ( $p=0,59$ ). <sup>13</sup>C-isotopfraktioneringen ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) med *Chlorella* sp. som födokälla kvarstår den avtagande trenden med temperatur och är signifikant ( $p=0,04$ ) i utfallet med färsk föda (Figur 8a & b) se appendix b.



Figur 8a. Lipidnormaliserade <sup>13</sup>C-isotopfraktioneringar ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) i *C. riparius* räknat

med **färsk föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.



Figur 8b. Lipidnormaliserade  $^{13}\text{C}$ -isotopfraktioneringar ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) i *C. riparius* räknat med **ansamlad föda**, i förhållande till temperatur. De grå tetragonerna (TetraMin®) och de ljusgrå kvadraterna (*Chlorella* sp.) med tillhörande felstaplar anger medelvärdet  $\pm$  standardavvikelsen.

### 3.3.4 Medelvärden $\pm$ standardavvikelse av $^{13}\text{C}$ - och $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar

$^{13}\text{C}$ -fraktioneringar utan lipidnormalisering av TetraMin® beräknade med färsk och ansamlad föda är  $1,282 \pm 0,127$  respektive  $0,749 \pm 0,158$ . För *Chlorella* sp. visar likadana beräkningar att  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen är  $-0,138 \pm 0,191$  för färsk föda och  $1,979 \pm 1,03$  för ansamlad föda.

$^{13}\text{C}$ -fraktioneringar med lipidnormalisering av TetraMin® beräknade med färsk och ansamlad föda är  $2,79 \pm 0,141$  respektive  $2,25 \pm 0,163$ . För *Chlorella* sp. visar likadana beräkningar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen är  $0,840 \pm 0,269$  för färsk föda och  $2,95 \pm 0,251$  för ansamlad föda.

$^{15}\text{N}$ -fraktioneringar av TetraMin® beräknade med färsk och ansamlad föda är  $3,919 \pm 0,014$  respektive  $0,789 \pm 0,07$ . För *Chlorella* sp. visar likadana beräkningar  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen är  $6,008 \pm 0,074$  för färsk föda och  $1,784 \pm 0,063$  för ansamlad föda.

## 4 Diskussion

### 4.1 Metodval

I denna studie matades fjädermygglarverna med tre olika födotyper för att få mer underlag kring huruvida temperaturen har en inverkan på fraktioneringen. De valda födorna har både olika ursprung och födokvalité, vilket minskar risken att påstå att temperaturen har en generell påverkan, då utfallet kan bero på födotyp och temperaturen i kombination. I naturen får fjädermygglarver C och N från flera födokällor, vilket även argumenterar för valet att testa fraktioneringen av olika födor i olika temperaturer. När larverna hade uppnått det fjärde larvstadiet, i ett eller i flera av replikaten för en födotyp, avbröts försöket. Försöket avbröts på det beskrivna viset för att larverna skulle ha samma ålder, det vill säga, ha assimilerat C och N lika länge. På det viset blir larverna matade med samma föda vid olika temperaturer jämförbara.

En "tvåvägs" ANOVA utfördes då en "envägs" ANOVA hade behandlat varje temperatur (15°C, 18°C och 23°C) likt enskilda behandlingar. Resultaten från en "envägs" ANOVA skulle ha angivit om det finns en signifikant skillnad mellan temperaturerna, men analysen tar exempelvis inte hänsyn till 23°C är varmare än 15°C och därmed kan inte resultaten påvisa om temperaturen har en påverkan inte.

### 4.2 Isotopsammansättning i födotyperna och *C. riparius*

Isotopsammansättningen av  $^{15}\text{N}$  ökade märkvärt i TetraMin® (3,24 ‰) och *Chlorella* sp. (4,35 ‰) med stigande temperatur (Figur 1a & b). Denna trend borde även synas hos fjädermygglarverna, men larverna följer inte födans trend. En förklaring till att födans  $\delta^{15}\text{N}$  dynamik inte återspeglas i larverna kan vara att mängden läckagematerial från födan och mikrobiell ned-

brytning stabiliserats med temperaturen (Figur 1b). Under mikroorganismer-  
nas nedbrytning tas läckagematerial upp, vilkas omsättning gör födan mer  
tillgänglig för larverna. Då dessa processer är temperaturberoende och där-  
med även tidsberoende, kan nedbrytningen av födan uppnått maximum och  
syns därför inte syns i larvernas  $\delta^{15}\text{N}$  dynamik (Figur 3b). En annan förkla-  
ring kan vara att larvens  $\delta^{15}\text{N}$  är ett resultat av allt larven ätit under sin livs-  
tid, det vill säga både färsk och ansamlad föda i vilka  $\delta^{15}\text{N}$  skiljer sig.

Med allöv som födokälla överlevde endast ett fåtal larver i klimatkammaren  
med 23°C, i resterande klimatkammare var dödligheten 100%. Den höga  
dödligheten kan förklaras av att allöv inte har bra födokvalité, C/N-kvoten  
var och förblev betydligt högre än hos TetraMin® och *Chlorella* sp. Att  
C/N-kvoten i allöv minskade markant från 17,7 i färsk föda till en stabilise-  
rad kvot omkring 11–12 i den ansamlade födan, stärker ovanstående resone-  
mang om temperaturen och tidens påverkan på mängden läckagematerial  
och mikrobiell nedbrytning. Experimentet hade överlag en hög dödlighet,  
vilken inte kan härledas. En förklaring kan vara att maten som tillsattes skå-  
larna räknades ut med mg C per larv och dag, vilket kan ha resulterat i att  
den tillförda mängden föda blivit för utspädd i förhållande till vattenvoly-  
men. Dödligheten hade möjligen minskat om födan istället hade räknats ut  
med mängden C per ytenhet eller volymenhet.

#### 4.3 $^{13}\text{C}$ - och $^{15}\text{N}$ -fraktionering i *C. riparius*

I denna studie beräknades två olika fraktioneringsutfall, ett med fraktioner-  
ingar beräknade på isotopsammansättningen i färsk föda och ett på isotop-  
sammansättningen i ansamlad föda. Beräkningarna utfördes för att se hur  
 $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen varierade beroende på vilka  $\delta^{13}\text{C}$ - och  $\delta^{15}\text{N}$ -  
värden i födan som användes och om temperaturen hade en signifikant på-  
verkan. När  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar beräknas på färsk TetraMin® och färsk  
*Chlorella* sp. skiljer sig fraktioneringen i larverna beroende på vad de ätit.  
 $^{13}\text{C}$ -fraktioneringarna avtar signifikant med TetraMin® och ökar signifikant  
med *Chlorella* sp. med stigande temperatur. Detta tyder på att  $^{13}\text{C}$ -fraktion-  
eringen är födoberoende och påverkas därmed olika utav temperaturen. När  
samma beräkningar utförs för  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar med ansamlad TetraMin®  
respektive *Chlorella* sp. avtar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar hos båda födotyper med  
stigande temperatur. Detta tyder på att födokällan inte påverkas olika utav  
temperaturen.

$^{15}\text{N}$ -fraktioneringen hos larver som ätit TetraMin® påverkas inte signifikant  
av temperaturen beräknat med både färsk och ansamlad föda. Larverna som  
ätit *Chlorella* sp. visar en signifikant ökning i  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringen med tem-  
peraturen. Dock har *Chlorella* sp. både i  $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar i an-  
samlad föda stor standardavvikelse. Den stora standardavvikelsen kan bero

på att larver som ätit *Chlorella* sp. endast erhöles i behandlingarna med 15°C och 18°C (Figur 5b). En mindre mängd data kan leda till stor varians då skillnader emellan prover kan utjämnas om provantalet är större. Vilket leder till att resultaten kan vara representativa för *Chlorella* sp. trots hög standardavvikelse, men fallet kan även vara det motsatta. Av denna anledning dras inga slutsatser utav larver som fötts upp på *Chlorella* sp.

#### 4.4 Lipidnormaliserade $^{13}\text{C}$ - och $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar i *C. riparius*

För larver som ätit TetraMin® avtar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen signifikant med stigande temperatur i beräkningar med både färsk och ansamlad föda, vilket visar att temperaturen har en påverkan på  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen. Post *et al.* (2007) visar sambandet mellan lipider och C/N-kvoten i organismer, där C/N-kvoten blir högre med ökat innehåll av lipider. Kopplingen mellan dessa förklaras av att C-halt och lipidhalt i organismer korrelerar, vilket gör att C/N-kvoten kan uppskatta lipidhalten i en organism. I förhållande till andra biomolekyler har lipider en lägre  $\delta^{13}\text{C}$ , vilket kan orsaka att organismer uppvisar en lägre  $^{13}\text{C}$ -fraktionering än den egentliga (Post *et al.*, 2007). I studien av Post *et al.* (2007) tas en matematisk "post hoc" normalisering av lipider fram (appendix d), som är ett alternativ till lipidextrahering och metoderna anses jämförbara. Huruvida lipiderna påverkar  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen beror på koncentrationen av lipider i organismen. En lipidnormalisering rekommenderas för akvatiska organismer med en C/N-kvot > 3,5 (Post *et al.*, 2007). För att undersöka om lipidhalten i fjädermygglarverna möjligen orsakar sambandet mellan  $^{13}\text{C}$ -fraktionering och temperatur (C/N-kvot > 4,17) korrigeras  $\delta^{13}\text{C}$ -värdena i larverna med den matematiska lipidnormalisering av Post *et al.* (2007). Efter lipidnormaliseringen har temperaturen ingen påverkan på  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) i beräkningarna med varken färsk eller ansamlad föda hos larver som ätit TetraMin®.

*C. riparius* lagrar energi i bland annat glykogen, lipider och triglycerider (Servia *et al.*, 2006). Vilken av energiförråden som är störst hos larverna är svårt att säga och det gör det svårt att veta om lipidnormaliseringen är aktuell eller inte. Genom att använda lipidnormalisering ( $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ ) kan resultaten överskatta, medan  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar utan lipidnormalisering ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ) kan underskatta fraktioneringen. Detta innebär att temperaturen kan ha en inverkan på  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen, samtidigt som denna trend kan uppkomma av lipidhaltens inverkan på fraktioneringen. Resultaten i denna studie, som varade i totalt 27 dagar, visar att  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  är föränderliga med temperaturen i både födan och larverna. De faktiska värdena av  $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringarna ligger sannolikt emellan fraktioneringsvärdena med färsk och ansamlad föda. Jag anser att isotopsammansättningen för  $^{13}\text{C}$  och  $^{15}\text{N}$  i den

ansamlade födan bör användas vid fraktioneringsberäkningar eftersom det efterliknar naturliga förhållanden mer. I naturen sker materialläckage och mikrobiell nedbrytning vilket gör att isotopsammansättningen inte håller sig konstant från ”färska” till ”ansamlad” föda, då födan genomgår flera fraktioneringar innan den äts av larven. Genom att använda den ansamlade födan fås dessutom värden som kan kopplas till larverna i samma replikat. Jag anser därav att dessa data ihop med  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar med lipidnormalisering kan spegla den faktiska fraktioneringen något bättre. Lipidnormaliseringen bör användas för att minska eventuella feltolkningar av fraktioneringen.

$^{15}\text{N}$ -fraktioneringarna beräknat med ansamlad föda för TetraMin<sup>®</sup> och *Chlorella* sp. i denna studie ligger inom samma intervall ( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ : 0,67–2,7‰) som i en studie på *C. riparius* av Goedkoop *et al.* (2006), vilket validerar mina resultat.  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar med eller utan lipidnormalisering, ligger inom det möjliga fraktioneringsintervallet för C ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ : -3 till 4 ‰) och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar i den ansamlade födan ligger inom intervallet för N ( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ : 0,5 till 5,5 ‰) för akvatiska organismer som Post (2002) beskriver i sin studie, vilket validerar mina resultat ytterligare.



## 5 Slutsats

Det är svårt att beräkna korrekta fraktioneringsvärden då sanningen ligger någonstans mittemellan att larven äter färsk och ansamlad föda. Enligt denna studie rekommenderas lipidnormalisering vid  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringar i kombination med ansamlad föda. Mer exakta fraktioneringsvärden skulle exempelvis kunna erhållas om  $\delta^{13}\text{C}$  och  $\delta^{15}\text{N}$  i födan hölls konstant genom hela försöket. Dock skulle inte ett försök med det beskriva upplägget svara på denna studies frågeställningar, då temperaturens inverkan på fraktioneringen även innebär en tidsaspekt.

Studierna av Post (2002) och Goedkoop *et al.* (2006) har inte undersökt temperaturens inverkan på  $^{13}\text{C}$ - eller  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar. Då data från denna studie ligger inom samma intervall som Post (2002) och Goedkoop *et al.* (2006), dras slutsatsen att temperaturen sannolikt inte påverkar den trofiska fraktioneringen mellan växt och konsument. Detta innebär att det inte behövs göras några korrigeringar för fraktioneringarna ur ett temperaturperspektiv. När paleolimnologiska sedimentprover tas kan exempelvis skallar av fjädermygglarverna rekonstruera tillstånd i sjöar, utan att temperaturen ger feltolkningar. De ekologiska effekterna av oligotrofieringen i arktiska sjöar behöver inte vid studerandet av exempelvis näringsvävar med isotopanalyser korrigeras för temperaturen för att kunna tolka födokälla eller trofinivå. Resultaten bidrar till att temperaturens påverkan på fraktioneringen troligtvis kan uteslutas.

## Referenslista

Adrian, R., O'Reilly, C. M., Zagarese, H., Baines, S. B., Hessen, D. O., Keller, W., Livingstone, D. M., Sommaruga, R., Straile, D., Van Donk, E., Weyhenmeyer, G. A. & Winder, M. (2009). Lakes as sentinels of climate change. *Limnology and Oceanography* [online], 54(6part2), pp 2283–2297. Available from: [http://doi.wiley.com/10.4319/lo.2009.54.6\\_part\\_2.2283](http://doi.wiley.com/10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2283). [Accessed 2018-04-26].

Arvola, L., Järvinen M, Tulonen T. (2011). Long-term and regional differences of phytoplankton in large Finnish lakes. *Hydrobiologia* 1: 125– 134

Barnes, C., Sweeting, C. J., Jennings, S., Barry, J. T. & Polunin, N. V. C. (2007). Effect of temperature and ration size on carbon and nitrogen stable isotope trophic fractionation. *Functional Ecology* [online], 21(2), pp 356–362. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2435.2006.01224.x>. [Accessed 2018-06-13].

Birks, H. J. B. QUANTITATIVE PALAEOENVIRONMENTAL RECONSTRUCTIONS. p 49.

Bondesson, A. (2017). Näringsutarmning ett okänt problem. Miljörender från SLU tema klimatförändringar. s. 26–27. Tillgänglig: [https://www.slu.se/globalassets/ew/ew-centrala/miljo/hall-dig-uppdatera-rad/miljotrender-arkiv/2017/miljotrender\\_2017\\_single\\_webb.pdf](https://www.slu.se/globalassets/ew/ew-centrala/miljo/hall-dig-uppdatera-rad/miljotrender-arkiv/2017/miljotrender_2017_single_webb.pdf) [2018-06-12]

Dicks, L., Almond, R., McIvor, A. & Arctic Monitoring and Assessment Programme (2013). *Arctic climate issues 2011: changes in Arctic snow, water, ice and permafrost* [online]. Available from: <http://www.deslibris.ca/ID/239935>. [Accessed 2018-06-28].

Eimers, M. C., Watmough, S. A., Paterson, A. M., Dillon, P. J. & Yao, H. (2009). Long-term declines in phosphorus export from forested catchments in south-central Ontario. (Prairie, Y., Ed) *Canadian Journal of Fisheries and*

*Aquatic Sciences* [online], 66(10), pp 1682–1692. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/F09-101>. [Accessed 2018-06-28].

Fry, B. (2008). *Stable Isotope Ecology*. New York: Springer Science + Buisness Media, LLC.

Goedkoop, W., Akerblom, N. & Demandt, M. H. (2006). Trophic fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in *Chironomus riparius* reared on food of aquatic and terrestrial origin. *Freshwater Biology* [online], 51(5), pp 878–886. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2427.2006.01539.x>. [Accessed 2018-06-13].

Goedkoop, W. & Angeler, D. Biologiska och vattenkemiska förändringar i arktiska och arktisk/alpina sjöar. p 17.

Grover, M., Camilleri, M., Hines, J., Burton, D., Ryks, M., Wadhwa, A., Sundt, W., Dyer, R. & Singh, R. J. (2016).  $^{13}\text{C}$  mannitol as a novel biomarker for measurement of intestinal permeability. *Neurogastroenterology & Motility* [online], 28(7), pp 1114–1119. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nmo.12802>. [Accessed 2018-06-20].

Jones, R. I., Grey, J., Sleep, D. & Quarmby, C. (1998). An assessment, using stable isotopes, of the importance of allochthonous organic carbon sources to the pelagic food web in Loch Ness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online], 265(1391), pp 105–110. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1998.0270>. [Accessed 2018-06-14].

Lampert & Sommer. (1997). *Limnoecology the ecology of lakes and streams*. New York; Oxford University Press.

Leavitt, P. R., Fritz, S. C., Anderson, N. J., Baker, P. A., Blenckner, T., Bunting, L., Catalan, J., Conley, D. J., Hobbs, W. O., Jeppesen, E., Korhola, A., McGowan, S., RÜhland, K., Rusak, J. A., Simpson, G. L., Solovieva, N. & Werne, J. (2009). Paleolimnological evidence of the effects on lakes of energy and mass transfer from climate and humans. *Limnology and Oceanography* [online], 54(6part2), pp 2330–2348. Available from: [http://doi.wiley.com/10.4319/lo.2009.54.6\\_part\\_2.2330](http://doi.wiley.com/10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2330). [Accessed 2018-06-20].

Masclaux, H. & Richoux, N. B. (2017). Effects of temperature and food quality on isotopic turnover and discrimination in a cladoceran. *Aquatic Ecology* [online], 51(1), pp 33–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10452-016-9592-1>. [Accessed 2018-06-13].

Minagawa, M., Wada, E. (1984). Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48, 1135-1140.

Owens, N. J. P. (1988). Natural Variations in  $^{15}\text{N}$  in the Marine Environment. *Advances in Marine Biology*. pp 389–451. Elsevier. ISBN 978-0-12-026124-6.

Palo, T. (1995). Atomer som budbärare – Isotoper skvallrar om ekologiska samspel. *Fakta skog – sammanfattar aktuell forskning vid Sveriges lantbruksuniversitet*. Tillgänglig: <https://www.slu.se/globalassets/ew/ew-centrala/forskn/popvet-dok/faktaskog/faktaskog95/4s95-03.pdf> [2018-05-02]

Péry, A. R. R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L. & Garric, J. (2002). A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online], 21(11), pp 2507–2513. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620211133>. [Accessed 2018-06-21].  
POST, D. M. (2002). USING STABLE ISOTOPES TO ESTIMATE TROPHIC POSITION: MODELS, METHODS, AND ASSUMPTIONS. 83(3), p 16.

Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J. & Montaña, C. G. (2007). Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* [online], 152(1), pp 179–189. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00442-006-0630-x>. [Accessed 2018-06-13].

Quinlan, R., Hall, R. I., Paterson, A. M., Cumming, B. F. & Smol, J. P. (2008). Long-term assessments of ecological effects of anthropogenic stressors on aquatic ecosystems from paleoecological analyses: challenges to perspectives of lake management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* [online], 65(5), pp 933–944. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/f08-027>. [Accessed 2018-06-28].

Servia, M. J., Péry, A. R. R., Heydorff, M., Garric, J. & Lagadic, L. (2006). Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* [online], 15(3), pp 229–240. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-005-0054-0>. [Accessed 2018-06-28].

SWIPA. (2011). AMAP, 2012. Arctic Climate Issues 2011: Changes in Arctic Snow, Water, Ice and Permafrost. SWIPA 2011 Overview Report. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo. xi + 97pp.

Tetra (u.å.) *TetraMin® Tropical Flakes*. Tillgänglig: <http://www.tetra-fish.com/products/nutrition/tetramin-tropical-flakes.aspx> [2018-06-18]

Uppsala vatten (2017). *Hårdhet och flouridinnehåll i dricksvattnet*. Tillgänglig: <https://www.uppsalavatten.se/tvattmedel> [2018-06-18]

Vincent, W. F. & Laybourn-Parry, J. (2008). *Polar Lakes and Rivers* [online]. Oxford University Press. Available from: <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780199213887.001.0001/acprof-9780199213887>. [Accessed 2018-06-13].

## Tack

Jag vill rikta ett stort tack till mina handledare Willem Goedkoop, Simon Belle och Jenny Nilsson för att jag fått möjligheten och förtroendet att utföra detta experiment. Forskningen som jag har fått göra har varit det roligaste momentet under mina studieår. Tack för all hjälp, motivation och för visad förståelse. Tack Richard Johnson som tagit sig tiden och uppdraget att vara min examinerare. Jag vill även tacka min mamma som alltid får mig att inse vad som är viktigast här i livet. Tack för allt stöd under dessa år, för att du får mig att tro på mig själv och gör så att jag vågar utmana mig, tack!

## Appendix

### a) Beräkningar för föda (mg C per larv och dag)

0,4 mg C/larv och dag

15 larver/skål  $\rightarrow 0,4 \cdot 15 = 6$  mg C/skål

TetraMin®: C ~ 37 %

$\rightarrow (6 \text{ mg C/larv och dag}) / 0,37 = 16 \text{ mg/skål och dag}$

Allöv: C =  $42,4 \pm 0,2$  % (Chauvet, 1987)

$\rightarrow (6 \text{ mg/skål och dag}) / 0,424 = 14 \text{ mg/skål och dag}$

*Chlorella* sp.: C ~ 40 %

$\rightarrow (6 \text{ mg/skål och dag}) / 0,40 = 15 \text{ mg/skål och dag}$

### b) Tabell 2. Resultaten från en "tvåvägs" ANOVA. Variansanalysen är utförd av Simon Belle och tabell 2 är skapad av Simon Belle.

Tabell 2. Resultat från en "tvåvägs" ANOVA där effekten av temperatur och födotyp i kombination testas för  $^{13}\text{C}$ - och  $^{15}\text{N}$ -fraktioneringar i fjädermygglarverna.

Färsk föda			$\Delta^{13}\text{C}$ (‰)			
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	p-value
	$R^2 = 0.84$	Intercept	2.56	0.58	4.4	< 0.001
	$p\text{-value} < 0.001$	Temperature: <i>Chlorella</i> sp.	-0.16	0.04	-4.6	< 0.001
		Temperature:Tetra-Min	-0.07	0.03	-2.3	0.04
			$\Delta^{13}\text{C}_{\text{norm}}$ (‰)			
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	p-value
	$R^2 = 0.84$	Intercept	2.69	0.81	3.3	< 0.001
	$p\text{-value} < 0.001$	Temperature: <i>Chlorella</i> sp.	-0.11	0.05	-2.3	0.04
		Temperature:Tetra-Min	0.01	0.04	0.1	0.88
		$\Delta^{15}\text{N}$ (‰)				
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	p-value

	$R^2 = 0.91$ $p\text{-value} < 0.001$	Intercept Temperature: <i>Chlorella</i> sp. Temperature:Tetra-Min	4.61 0.09 -0.04	0.60 0.04 0.03	7.7 2.3 -1.2	< 0.001 0.03 0.25
Ansamlad föda	$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰})$					
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	$p\text{-value}$
	$R^2 = 0.74$ $p\text{-value} < 0.001$	Intercept Temperature: <i>Chlorella</i> sp. Temperature:Tetra-Min	2.72 -0.03 -0.11	0.85 0.05 0.04	3.2 -0.7 -2.4	< 0.001 0.52 0.02
	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{norm}} (\text{‰})$					
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	$p\text{-value}$
	$R^2 = 0.30$ $p\text{-value} = 0.03$	Intercept Temperature: <i>Chlorella</i> sp. Temperature:Tetra-Min	2.84 0.02 -0.03	1.13 0.07 0.06	2.5 0.2 -0.5	0.02 0.81 0.59
	$\Delta^{15}\text{N} (\text{‰})$					
			Esti- mate	Std. Error	t va- lue	$p\text{-value}$
	$R^2 = 0.43$ $p\text{-value} < 0.001$	Intercept Temperature: <i>Chlorella</i> sp. Temperature:Tetra-Min	-0.73 0.14 0.08	1.01 0.06 0.05	-0.7 2.3 1.5	< 0.001 0.03 0.16

c) Tabell 1. Antalet överlevande larver i behandlingarna.

Tabell 1. Antalet (n) larver som erhöles från varje replikat (kod). 15, 18 och 23 representerar respektive temperatur. T (TetraMin® och C (*Chlorella* sp.) anger födotyp och den följande siffran anger replikatet.

Kod	Antal larver (n)
15T1	5
15T2	1
15C1	1
15C2	3



15C3	2
15C4	2
18T1	5
18T2	7
18T3	1
18T4	8
18C1	4
18C2	4
18C3	2
18C4	2
23T1	2
23T2	4
23T3	2

- d)** Lipidnormalisering av  $^{13}\text{C}$ -fraktioneringen enligt Post et al (2007).  

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{norm}} = \delta^{13}\text{C}(\text{larv}) - 3,32 + 0,99 * \text{C:N} \quad (\text{ekv. 3})$$